

MTA doktori értekezés tézisei

Szuperrezolúciós optikai módszerek fejlesztése és mikroszkópiai alkalmazása

Erdélyi Miklós

Optikai és Kvantumelektronikai Tanszék, Fizikai Intézet

Szegedi Tudományegyetem

2020. június

A kutatások előzménye

A leképezési hibáktól mentes optikai képalkotó eszközök térbeli feloldását az alkalmazott fény hullámhossza és a lencserendszer numerikus apertúrája határozza meg. A diffrakciós küszöbnél nagyobb térbeli feloldást elérő technikákat összefoglalóan szuperrezolúciós módszereknek nevezzük. E módszerek fejlesztése és alkalmazása az élet- és élettelen tudományokban évtizedek óta a figyelem középpontjában van.

Az élettelen tudományok illetve technika területén ezt a tendenciát jól mutatja az optikai mikrolitográfiai módszerek fejlődése. Moore-törvénye [1] értelmében a felületegységre eső mikroelektronikai eszközök száma egy-másfél évente megduplázódik. A piac által diktált igények a legegyszerűbben – még a diffrakciós limit keretei között maradván – a numerikus apertúra növelésével vagy az alkalmazott fény hullámhosszának csökkentésével elégíthetők ki [2-3]. Ám mindkét eljárás a mélységélesség csökkenésével jár, ami erősen korlátozza a mikroprocesszor gyártási technológiáját [4]. Ezért már az 1990-es években számos alternatív módszert javasoltak a feloldás és a mélységélesség együttes növelésére, amelyek már a szuperrezolúció irányába mutattak. Az OPC (Optical Proximity Correction) eljárás [5], illetve a fázismaszkok (phase shifting mask) [6] alkalmazásával a maszkon lévő struktúrák amplitúdó/fázis viszonyait változtatták meg. A módszer technikailag nehezen kivitelezhető és drága, a litográfiai maszkokat tervező mérnököket nagy kihívás elé állította. A maszkok kivilágításának módosítása (off-axis stb.), technikailag egyszerűbb megoldást jelentett [7], de a képminőség javulása erősen függött a leképezett struktúra geometriájától. Az IC (Integrated Circuit) gyártás generációváltásai jelentős kutatási kapacitásokat és anyagi befektetéseket követelnek meg, amelyek csak több ipari vállalatot összefogó konzorciumok (pl. Sematech, USA) létrejöttével váltak elérhetővé.

Az élettudományokban használt fluoreszcens optikai mikroszkópok térbeli feloldását a hullámhossz csökkentésével nem lehet praktikusán megoldani, mert az ultraibolya tartományba eső ($\lambda < 375$ nm) gerjesztés esetén a minta autofluoreszcenciája és a kromatikus hiba szerepe jelentősen megnő. A numerikus apertúra immerziós objektívek használatával a 1,5-es, maximális értékig növelhető. Ennek következtében biológiai mintákban a 250 nm laterális és 500 nm axiális méretnél kisebb struktúrákat hagyományos optikai mikroszkópokkal nem lehet feloldani. (Érdemes megjegyezni, hogy a mikrolitográfiával szemben a biológiai alkalmazásokban a mélységélesség csökkenése kifejezetten előnyös, mert javítja az axiális feloldást [8-9].) Az elmúlt időszakban számos szuperrezolúciós módszert fejlesztettek ki (Stimulated Emission Depletion: STED, Structured Illumination Microscopy: SIM, Single Molecule Localization Microscopy: SMLM, stb.) [10-13], amelyek közül a lokalizációs mikroszkópiai eljárás (SMLM) biztosítja a

legnagyobb térbeli feloldást. A módszer kifejlesztéséért 2014-ben W. E. Moerner és E. Betzig megosztva kémiai Nobel-díjat kaptak [14-15]. A lokalizációs mikroszkópia kifejlesztése idején (2006) egyetlen optikai elem sem volt optimalizálva a diffrakciós küszöb alatti térbeli feloldás eléréséhez. Az első szuperrezolúcióra tervezett objektívek, spektrális szűrők és mikroszkópvázak csak évekkel később jelentek meg a piacon. Jelenleg több neves mikroszkópgyártó cég is fejleszt és árul lokalizációs mikroszkópot, és a felvett képek kiértékelésére számos, szabadon hozzáférhető algoritmust dolgoztak ki [16]. A területen nagyon éles a verseny: a Google Scholar adatbázis szerint a „superresolution microscopy” területén 2009-ben kétezer, 2019-ben közel tizenkétezer cikk jelent meg. Ugyan a lokalizációs mikroszkópai módszer viszonylag új, ám a fejlesztési irányok tisztán kirajzolódnak. Az SMLM egy fotonszám limitált technika. A fluoreszcens molekula tipikusan pár ezer fotont képes emittálni, mielőtt kifakul (bleaching) vagy újra kikapcsolt állapotba kerül. E fotonok nagy hatásfokú detektálásával és megfelelő kiértékelésével feltérképezhetjük a fluoreszcens molekulák kémiai és fizikai környezetét, továbbá számot adhatunk a molekulák orientációjáról és mozgékonyágáról [17, 18]. A hardveres fejlesztések elsősorban a multimodális (3D, többszínű, polarizáció-érzékeny) illetve a korrelatív (elektron-, vagy atomerő mikroszkóppal kombinált) módszerek irányába tolódnak [19, 20]. Érdemes megemlíteni, hogy a lokalizációs módszer, a molekulák egyedi detektálása miatt ideális a minta kvantitatív kiértékeléséhez. Az elmúlt években számos módszert (klaszteranalízis, gépi tanulás stb.) kezdtek el alkalmazni a szuperrezolúciós képek kvantitatív kiértékeléséhez [21].

PhD hallgatóként 1994 és 2000 között megszakításokkal három évig a houstoni Rice Egyetemen fejlesztettem koherens és inkoherens többszörös leképezésen alapuló módszereket a Texas Instruments Inc. támogatásával. E projekt keretében Közép- és Kelet-Európából elsőként volt lehetőségünk látogatást tenni a Sematech cégnél. A kifejlesztett technikákat elsősorban optikai litográfiai célokra optimalizáltuk, a témában született saját eredményeim a PhD dolgozatom gerincét jelentették. Az MTA Doktori dolgozatom **4.1 fejezetében** tárgyalta – a pontátviteli függvény (Point Spread Function: PSF) kettősen törő lemez segítségével történő módosításán alapuló – eredmények még e kutatások lezárását jelentik. A Rice Egyetemről visszatérve Szegeden bekapcsolódtam a GE Healthcare által támogatott CT (Computer Tomography) képek minőségének javítását célzó projektbe. A kutatási témát az optikai tartományra kiterjesztve fejlesztettünk ki egy újfajta, izotróp képalkotást biztosító tomografikus optikai mikroszkópai (TOM) módszert. A dolgozatom **4.2 fejezetében** e fejlesztésben játszott szerepemet és az elért eredményeket mutatom be. A kifejlesztett módszerek képesek a térbeli feloldást növelni, de a molekuláris szintű folyamatok követésére nem alkalmasak. 2010-ben EPSRC-NPL posztdoktori ösztöndíjat nyertem, melynek révén három évet töltöttem a Cambridge-i Egyetemen és a londoni

Nemzeti Fizikai Kutatóintézetben (NPL). A projekt keretében Angliában megépítettem az első dSTORM (direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [22] elven működő lokalizációs mikroszkópokat. Miután 2013-ban hazatértem a Szegedi Tudományegyetemre, Marie Curie, Nemzeti Agykutatási Program, Bolyai János kutatói ösztöndíj, GINOP, és OTKA pályázatok támogatásával itthon is építettem és folyamatosan fejleszték egy lokalizációs mikroszkópot. A dolgozatomban öt fejezetében (4.3-4.7) foglalom össze a területen elért, alkalmazásorientált fejlesztési és kutatási eredményeimet. A nemzetközi trendet követve fejlesztéseink a 3D, polarizáció-érzékeny és többszínű leképezést, valamint a rekonstruált képek kvantitatív kiértékelését tűzték ki célul [23].

Végezetül érdemes megemlíteni, hogy összes előnye ellenére a lokalizációs mikroszkópia még mindig keresi a legalkalmasabb felhasználási területet. Az első, kifejezetten a módszerhez köthető eredmény az aktíngyűrűk felfedezése és elemzése volt [24]. Jelenleg úgy tűnik, hogy a puffervolyadék nélküli (pl. Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography: PAINT) módszerek [25] alkalmazása kerül az előtérbe, amelyek utat nyitnak az élősejtes minták leképezése felé.

Célkitűzések

A dolgozatomban ismertetett munkám általános motivációja az optikai leképezés minőségének, elsősorban a térbeli feloldásnak a javítása volt. A kidolgozott módszereket mindig igyekeztem tényleges biológiai problémák megoldására használni, illetve több esetben éppen a biológus kollégák által felvetett problémák inspirálták a fejlesztéseket. Az általánosan megfogalmazott motiváción belül a következő specifikus célokat tűztem ki:

- Szimulációval és kísérletekkel kívánom megvizsgálni, hogy egy kettősen törő lemezen való átfókuszálás hogyan és milyen mértékben változtatja meg a PSF-et. Megvizsgálom, mennyire lehet függetlenül létrehozni a merőleges polarizációs állapotokhoz tartozó ordinárius és extraordinárius fókuszokat. Egy saját tervezésű konfokális mikroszkópot építetek, amellyel kísérletileg kiértékelem a módszer alkalmazhatóságát a mélységelesség növelésére. Eljárást dolgozok ki radiálisan és azimutálisan polarizált nyalábok generálására.
- Egy tomografikus elven működő, vonalpáztázó optikai mikroszkóprendszert (LSTOM) fejlesztetek ki, amelyben a látótér méretét nem korlátozza a nyaláb diffrakciója és a rekonstruált kép térbeli feloldása homogén. A nyaláb forgatása során fellépő kóválygási hiba kiküszöbölésére egy eltolás-invariáns kettősen törő lemezt tervezek használni, és az elrendezést szimulációkkal és kísérletekkel kívánom tesztelni.

- Egyedi modalitásokkal (tetszőleges irányú kivilágítás, 3D, többszínű leképezés) rendelkező lokalizációs mikroszkóprendszereket fejleszték, tesztelek és alkalmazok orvosi és biológiai minták vizsgálatára. A hardveres fejlesztéseken túl egy lokalizációs kódot is kidolgozok.
- A lokalizációs mikroszkóp szimulációjára, a lehetséges műtermékek vizsgálatára alkalmas kódot fejleszték ki. Összehasonlító kísérleti és szimulációs vizsgálatokat végzek a műtermékek jellemzésére és lehetséges kiküszöbölésükre.
- Egy olyan multimodális lokalizációs rendszert fejleszték ki, amely a 2D SMLM képek minőségi romlása nélkül képes 3D, polarizáció-érzékeny és többszínű leképezés megvalósítására.
- Egy kettősen törő lemez alkalmazásán alapuló polarizáció-érzékeny dSTORM módszert fejleszték ki, amely a látótér csökkentése nélkül képes az egyedi fluoreszcens molekulák orientációjának meghatározására.
- A szuperrezolúciós képek kvantitatív kiértékeléséhez értékmérőket adok meg, és protokollokat dolgozok ki ezen értékmérők meghatározásához. A kiértékelő rutinokat tesztelem és beépítem a lokalizációs kódba.
- Anizotrópia mérésére alkalmas TIRF (Total Internal Reflection Microscopy) és EPI kivilágítású fluoreszcens mikroszkóprendszert fejleszték, kalibrálok és alkalmazok, pl. fehérjék dimerizációjának követésére.

Vizsgálati módszerek

Dolgozatom jelentős részben kísérleti munkát foglal össze. Az elért eredmények döntő részét saját fejlesztésű optikai rendszerekkel értem el. A rendszerek tervezése, optimalizálása, tényleges összeépítése, tesztelése és alkalmazása a dolgozatom gerincét jelentik. A vezérléshez, adatgyűjtéshez és kiértékeléshez írt kódok szintén az eredményekhez tartoznak, ezért ezeket is a dolgozatban részletezem.

Új tudományos eredmények

- ***Egytengelyű, kettősen törő lemezen átfókuszált nyalábok elméleti és kísérleti vizsgálata témakörben megfogalmazott tézispontjaim:***

1. Egytengelyű, kettősen törő lemezen átfókuszált nyalábokra megvizsgáltam az ordinárius és extraordinárius fókuszok közötti áthallást abban az esetben, amikor a kristály optikai tengelye a

lemez síkjában van. Megállapítottam, hogy síkban polarizált nyalábbal a fókuszok nem gerjeszthetők egymástól függetlenül. Az áthallás két fő okának a fókuszáló objektív depolarizációját és a kettősen törő lemezt jellemző szkiodróm polarizációs vektorok kidőlését jelöltem meg. A két hatás tipikusan ellentétes irányú, ami növeli az áthallás mértékét ($\approx 10\%$, $0,5$ numerikus apertúra esetén). A hiba csökkentésére katadioptrikus rendszer alkalmazását javasoltam, és szimulációkkal megmutattam, hogy az áthallás 2% -ra csökkenthető. A numerikus apertúra függvényében szerzőtársaimmal közösen megvizsgáltam az optikai aberrációk mértékét. Megállapítottam, hogy a torzulások $0,1$ numerikus apertúra felett már jelentőssé válnak, ezért fedőlemezre korrigált objektíveket kell használni. Egy saját fejlesztésű konfokális mikroszkóppal kísérletileg megmutattam, hogy a lefókuszált nyaláb útjába optimalizált vastagságú és orientáltóságú, kettősen törő lemezt helyezve a leképezés mélységélessége több mint 100% -kal növelhető, miközben a laterális feloldás csupán 10% -kal csökken.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T1, T2, T3]

2. Elméleti és kísérleti vizsgálatokkal megmutattam, hogy megfelelően optimalizált kettősen törő lemezzel (amikor a kristály optikai tengelye merőleges a lemez síkjára), a radiálisan és azimutálisan poláros komponensek szétválaszthatók. Térbeli szűréssel a két komponenst nagy hatékonysággal tudtam szétválasztani. A javasolt optikai rendszert egy fázislemezzel kiegészítve a beeső, cirkulárisan polarizált nyalábot gyakorlatilag fényvesztés nélkül $m=1$ topológiai töltésű, radiálisan vagy azimutálisan polarizált nyalábbá alakítottam.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T4]

- ***Tomografikus elven működő vonalpásztázó optikai mikroszkóprendszer (LSTOM) fejlesztése témakörben megfogalmazott tézispontjaim:***

3. Egy újfajta, vonalpásztázáson alapuló tomografikus képrekonstrukciós optikai elrendezést dolgoztam ki, amiben a pásztázás iránya merőleges a vonalra és a nyaláb optikai tengelyére. Témavezetésemmel megmutattuk, hogy az elrendezésnek köszönhetően – a hagyományos transzmissziós geometriákkal szemben – a látótér méretét a nyaláb diffrakciója elvileg nem korlátozza, a rekonstruált kép térbeli feloldása homogén és izotróp. Megvizsgáltam, hogyan függ a rekonstruált képek minősége a szinogramok felvételénél beállított paraméterektől, és megmutattam, hogy vonalpásztázás miatt az LSTOM $\approx 20\%$ -os térbeli feloldásjavulást eredményez. Szakmai vezetésemmel társszerzőimmel közösen megépítettük és teszteltük a javasolt LSTOM optikai rendszert reflektív és fluoreszcens minták vizsgálatára, nyaláb- és

mintapásztázás alkalmazásával konfokális üzemmódban. A nyaláb forgatása során fellépő kóválygási hiba korrekciójára egy valós idejű mérési elrendezést javasoltam. A rendszer térbeli feloldását Richardson tesztmintával ellenőrizve a feloldást $\approx 15\%$ -kal sikerült növelni.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T5, T6, T7]

4. Kidolgoztam egy újfajta módszert az LSTOM mikroszkóphoz alkalmazható pásztázó nyaláb tisztán eltolás-invariáns optikai elemekkel (polarizátorral és kettősen törő lemezzel) történő generálására és forgatására a kóválygásból adódó hibák kiküszöbölésére. Számítógépes szimulációval megterveztem és optimalizáltam a mikroszkóprendszert, és szakmai vezetésemmel kísérletileg megmutattuk, hogy asztigmia bevezetésével a TOM mikroszkópban vonalpásztázásra használható a módosított pontátviteli függvény. A pásztázó nyaláb félértékszélességére kísérletileg kapott $0,495\ \mu\text{m}$ jó egyezést mutatott az elméleti $0,487\ \mu\text{m}$ értékkel.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T8]

• ***Lokalizációs mikroszkóprendszerek tervezése, fejlesztése és alkalmazása témakörben megfogalmazott tézispontjaim:***

5. Egyedi sajátosságokkal rendelkező dSTORM szuperrezolúciós mikroszkóprendszereket építettem és optimalizáltam. A rendszereket alkalmassá tettem EPI-HILO-TIRF kivilágításra/gerjesztésre, 3D és többszínű dSTORM felvételek készítésére. Optimalizáltam és teszteltem a mikroszkópokat, és számos alkalmazáson keresztül kísérletileg megmutattam, hogy a térbeli feloldás $20\ \text{nm}$ alá csökkenthető. Az Allan Variance módszerrel meghatároztam a mikroszkóp stabilitását és különválasztottam a minta és a rendszer által bevezetett hibákat. A stabilitási vizsgálatok megmutatták, hogy a rendszerhez köthető optimális 400-600 ms-os integrálási idő egy nagyságrenddel hosszabb, mint a dSTORM technikában tipikusan alkalmazott expozíciós idők. Szimulációkat és kísérleteket végeztem a rendszerben fellépő laterális kromatikus hiba eredetének és mértékének meghatározására. Megállapítottam, hogy a hiba elsődleges forrása a mikroszkópobjektív, a mértéke kisebb, mint a diffrakciólimitált feloldási küszöb, de a látótér szélén meghaladhatja a $100\ \text{nm}$ -t. Társszerzőimmal közösen elsőként mutattuk meg, hogy a dSTORM szuperrezolúciós módszer alkalmas $\text{A}\beta$ és lizozim aggregációjának vizsgálatára sejten és in-vitro körülmények között. A kísérletek bizonyították azt a hipotézist, hogy az $\text{A}\beta_{1-40}$ és $\text{A}\beta_{1-42}$ fehérjék endocitózissal be- illetve visszakkerülhetnek a sejtekbe, ahol aggregálódnak.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T9, T10, T11, T12, T13]

6. Egy szabadon hozzáférhető, egyedi lehetőségekkel rendelkező lokalizációs kódot (rainSTORM) fejlesztettem ki szerzőtársaimmal közösen a felvett dSTORM adatok feldolgozására, a szuperrezolúciós képek vizualizációjára és kvantitatív elemzésére. A program képes klaszter analízist végezni a végső szuperrezolúciós képeken, markerek használata nélkül 2D-ben korrigálni a mérés során fellépő laterális driftet, és trajektória-illesztéssel összekötni az egymást követő képkockákon az ugyanazon molekulához tartozó felvillanásokat. A program a kiszűrt lokalizációkból is képes képet alkotni, segítve ezzel a lehetséges műtermékek okainak meghatározását. Fluoreszcens mikrogömbök leképezésén alapuló kalibrációs eljárást adtam meg és építettem be a lokalizációs kódba a kromatikus hiba kiküszöbölésére.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T13, T14, T15]

- *A lokalizációs mikroszkópiában jelentkező műtermékek vizsgálata és lehetséges kiküszöbölésük témakörben megfogalmazott tézispontom:*

7. Elsőként fejlesztettem ki egy univerzális, a teljes SMLM mikroszkóprendszer szimulációjára alkalmas kódot. A szerzőtársaimmal közösen megírt testSTORM program az egyedi fluoreszcens molekulák képeit (PSF) skalár- vagy vektor-diffrakciós modellel számolja, 2D vagy 3D (asztigmia) esetben. Többszínű leképezésnél figyelembe veszi a spektrális áthallást. Magas autofluoreszcencia vagy nem specifikus jelölés figyelembevételéhez strukturált háttérrel terheli a képet. A minta mozgásának szimulációjához a drift paramétereit lehet megadni. A polarizáció-érzékeny detektáláshoz definiálni lehet a festékek kötési paramétereit (a linker hosszát és irányítottságát). A kód segítségével optimalizálhatók a kritikus paraméterek és meghatározható a végső kép paraméterfüggése (process window). A kód használata gyorsabbá, egyszerűbbé és olcsóbbá teszi az előkészületi munkát. Az SMLM mikroszkópiában megjelenő műtermékeket eredetük (minta, mikroszkóp és algoritmus) szerint három csoportba soroltam, majd elemeztem az egyes hibák hatását a végső nagyfeloldású képekre. Megvizsgáltam és javaslatot tettem a lehetséges kompenzációs lehetőségekre. A program segítségével alátámasztottam azt a feltételezést, hogy a dSTORM technikában a vezikulák leképezésénél gyakran megjelenő, a vezikulákat összekötő hidak műtermékek, a vezikulák a valóságban nincsenek összekötve.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T16, T17, T18, T19, T20]

- ***Multimodális lokalizációs módszerek fejlesztése témakörben megfogalmazott tézispontjaim:***

8. Egy kettősen törő lemez alkalmazásán alapuló újfajta polarizáció-érzékeny SMLM módszert dolgoztam ki. Az elrendezés akromatikus, a két fókuszpontot hullámhossztól függetlenül (<10% változás) szeparálja. A lemez eltolás-invariáns és egyenes látású, ezért könnyű beállítani, gyorsan lehet váltani a hagyományos 2D és a polarizáció-érzékeny modalitások között. A módszer – más polarizációs eljárásokkal szemben – nem csökkenti a látóteret, az alkalmazott EMCCD kamera teljes detektorfelülete használható. A megépített rendszert szerzőtársaimmal közösen kísérletileg teszteltük phalloidin-AF647 festékkel jelölt aktin- és ThT-vel jelölt inzulinszálak leképezésével, és a mérési eredmények alapján meghatároztuk a szálakhoz kötött festékmolekulák polarizációs fokát.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T21]

9. Egy kettős-objektív elrendezésen alapuló újfajta eljárást javasoltam és dolgoztam ki, amely az eredeti 2D SMLM képek minőségi romlása nélkül képes 3D, polarizáció-érzékeny és többszínű leképezés megvalósítására. Az OSLO szimulációs programmal elvégeztem az elsődleges és másodlagos képek összehasonlító elemzését. Témavezetésemmel fluoreszcens festékkel jelölt aktinszálak leképezésével kísérletileg is megmutattuk, hogy a másodlagos fotonok segítségével megfelelő minőségű szuperrezolúciós képeket lehet felvenni. A 3D asztigmia, a 3D biplane és a többszínű modalitások kísérleti megvalósíthatóságát szarkomer és fluoreszcens mikrogömböket alkalmazva mutattam meg.

A tézisponthoz tartozó publikációk: [T22]

- ***Lokalizációs adatok kvantitatív kiértékelése témakörben megfogalmazott tézispontjaim:***

10. DNS szálak kettős-törési helyeiről felvett dSTORM szuperrezolúciós képek kvantitatív elemzését végeztem el. Az adott jelölési protokoll mellett kísérletek alapján témavezetésemmel meghatároztuk, hogy egy jelzett γ -H2AX molekula átlagosan mennyi felvillanást eredményez a szuperrezolúciós adatsorban, azaz megadtuk a rendszer válaszfüggvényét. A kiértékeléshez

szükséges algoritmusok (trajektória-illesztés, klaszteranalízis) beépítésre kerültek a rainSTORM lokalizációs programba. Az eredmények rámutattak, hogy a teljes sejtmagra kiterjedő klaszteranalízis lehetőséget ad a fókuszok és az azokat alkotó nanofókuszok térbeli eloszlásának, méretének és a bennük lévő γ -H2AX molekulák számának meghatározására. A mérések megmutatták, hogy az egyes fókuszokban lévő γ -H2AX molekulák száma egyenesen arányos a klasztermérettel, azaz a rendszer kalibrálásával a klaszterméretből (aminek a meghatározásához nem feltétlenül szükséges szuperrezolúciós mikroszkópia) megadható a γ -H2AX molekulák száma. A TestSTORM szimulációk megmutatták, hogy a 2D mérések kiértékelésével kapott eredmények jó egyezést mutatnak a tényleges 3D struktúrák valódi paramétereivel.

A tézisponthoz tartozó publikációk [T23, T24]

11. A *Drosophila* repülőizmának alapegységét jelentő szarkomer 27 fontosabb fehérjéjének relatív pozícióját határoztam meg szerzőtársaimmal a szuperrezolúciós dSTORM módszerrel 5-10 nm pontossággal. A szakmai irányításommal felvett képeket három típusba soroltuk, és a különböző struktúrákat jellemző geometriai paraméterek (rés szélessége, vonal szélessége, vonalak távolsága) megadásánál figyelembe vettük a jelölésnél használt antitestek jellemző méretét és a lokalizációs pontosságot.

A tézisponthoz tartozó publikációk [T25]

- ***Fluoreszcens anizotrópiás vizsgálatok témakörben megfogalmazott tézispontom:***

12. Időátlagolt fluoreszcencia anizotrópia mérésére alkalmas feltétet terveztem és építettem egy gyári mikroszkóphoz. A rendszert egyedi módon úgy terveztem, hogy gyors váltásra legyen alkalmas EPI és TIRF gerjesztési módok között. Egy újfajta protokollt fejlesztettem ki TIRF kivilágítás esetén az s polarizációs gerjesztés pontos beállítására. Megbecsültem a polarizációs áthallásból származó depolarizáció fokát. A kapott érték jobb egyezést mutatott a kísérletekkel, mint a korábban más szerzők által publikált becslések, ezért a kiértékelésnél a saját korrekciós faktort használtam. Szoftvert fejlesztettem a polarizációs képek regisztrálására, a depolarizáltság és a G-faktor figyelembevételével a fluoreszcencia anizotrópia kiszámítására. A kifejlesztett rendszerrel a P2Y1 fehérjék dimerizációjának időbeli lefutását vizsgáltam. A mérés során EPI és TIRF kivilágítások között váltva fluoreszcencia anizotrópiát mértem. A fehérjéket (P2Y1) fluoreszcens fehérjével (mTFP) jelölve a „red-edge” gerjesztéssel külön tudtam választani a forgásból és a FRET-ből (Fluorescence Resonance Energy Transfer) eredő anizotrópia változást, és megmutattam, hogy a dimerekben az anizotrópia döntő részben a fluoreszcens molekulák között

fellépő HOMO-FRET miatt csökken. E csökkenést térben szeparálva mértem a sejtmembránban (TIRF) és a sejten belül (EPI). Az anizotrópiát 2-4%-os relatív pontossággal mérve a sejtmembránban a dimer/monomer arányt $45 \pm 20\%$ -nak becsültem, ahol a hibát az egyedi sejtek között mért értékek szórása okozta.

A tézisonthoz tartozó publikációk: [T26, T27, T28]

Az eredmények hasznosítása

A kifejlesztett módszerek, eszközök és programok közvetlenül alkalmazhatók fluoreszcens biológiai minták nagy (<10 nm) térbeli feloldású leképezésére. A módszerek jellegüknél fogva alkalmasak sejtekben lezajló biokémiai folyamatok egymolekula szintű követésére. A dolgozatban számos közvetlen példával támasztom alá, hogy az elért eredményeket már más, független kutatócsoportok is alkalmazzák. A kifejlesztett programok szabadon letölthetők és futtathatók. A dolgozatban ismertetett szegedi mikroszkóprendszer az általam vezetett AdOptIm kutatócsoport kezelésében várja az együttműködő partnereket. Jelenleg több mint tíz kutatócsoporttal állunk szoros szakmai kapcsolatban.

A kettősen törő lemez segítségével történő PSF manipuláció a polarizációs dSTORM módszerben közvetlenül felhasználásra került. A radiálisan polarizált nyaláb generálására javasolt eljárás a STED szuperrezolúciós módszernél alkalmazható.

A tomografikus optikai mikroszkóprendszert szabadalmaztattuk, de az elmúlt évtizedben az SMLM/STED/SIM szuperrezolúciós módszerek fejlesztése és alkalmazása került a kutatás és a kutatók figyelmének középpontjába.

Irodalmi hivatkozások listája

1. M. M. Waldrop, “The chips are down for Moore’s law”, Nature News 530(7589), 144, (2016).
2. P. Rai-Choudhury, “Handbook of microlithography, micromachining, and microfabrication: microlithography”, (Vol. 1), (1997).
3. B. W. Smith, and K. Suzuki, “Microlithography: science and technology”, CRC press. (2018).
4. A. K. Wong, “Microlithography: Trends, challenges, solutions, and their impact on design”, IEEE Micro 23(2), 12-21, (2003).
5. N. B. Cobb, A. Zakhor, and E. A. Miloslavsky, “Mathematical and CAD framework for proximity correction”, Optical Microlithography IX Vol. 2726, 208-222, International Society for Optics and Photonics, (1996).
6. T. Terasawa, N. Hasegawa, T. Kurosaki, T. and Tanaka, “0.3-micron optical lithography using a phase-shifting mask”, Optical/Laser Microlithography II (Vol. 1088, 25-33). International Society for Optics and Photonics, (1989).
7. J. F. Chen, and J. A. Matthews, “Masks for improved lithographic patterning for off-axis illumination lithography”, U.S. Patent 5,447,810, MicroUnity Systems Engineering Inc, (1995).
8. P. Török, and T. Wilson, “Rigorous theory for axial resolution in confocal microscopes”, Optics Communications 137(1-3), 127-135, (1997).
9. T. Wilson, “Resolution and optical sectioning in the confocal microscope”, Journal of microscopy 244(2), 113-121, (2011).
10. S. W. Hell, and J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”, Optics letters 19(11), 780-782, (1994).
11. M. G. Gustafsson, “Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution”. Proceedings of the National Academy of Sciences 102(37), 13081-13086, (2005).
12. M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)”, Nature methods 3(10), 793-796, (2006).
13. E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess, “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution”, Science 313(5793), 1642-1645, (2006).
14. E. Betzig, “Single molecules, cells, and super-resolution optics”, Nobel Lecture, Angewandte Chemie International Edition 54(28), 8034-8053, (2015).
15. W. E. Moerner, “Single-molecule spectroscopy, imaging, and photocontrol: foundations for super-resolution microscopy (Nobel lecture)”, Angewandte Chemie International Edition 54(28), 8067-8093, (2015).

16. D. Sage, T. A. Pham, H. Babcock, T. Lukes, T. Pengo, J. Chao, R. Velmurugan, A. Herbert, A. Agrawal, S. Colabrese, and A. Wheeler, “Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software”, *Nature Methods* 16(5), 387-395, (2019).
17. A. S. Backer, M. Y. Lee, and W. E. Moerner, “Enhanced DNA imaging using super-resolution microscopy and simultaneous single-molecule orientation measurements”, *Optica* 3(6), 659-666, (2016).
18. D. Baddeley, and J. Bewersdorf, “Biological insight from super-resolution microscopy: what we can learn from localization-based images”, *Annual review of biochemistry* 87, 965-989, (2018).
19. M. Sauer, and M. Heilemann, “Localization-based super-resolution microscopy” *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, (2017).
20. S. Brasselet, “Polarization-resolved nonlinear microscopy: application to structural molecular and biological imaging”, *Advances in Optics and Photonics* 3(3), 205, (2011).
21. H. Deschout, A. Shivanandan, P. Annibale, M. Scarselli, and A. Radenovic, “Progress in quantitative single-molecule localization microscopy”, *Histochemistry and cell biology* 142(1), 5-17, (2014).
22. M. Heilemann, S. Van De Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer, “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes”, *Angewandte Chemie International Edition* 47(33), 6172-6176, (2008).
23. S. W. Hell, S. J. Sahl, M. Bates, X. Zhuang, R. Heintzmann, M. J. Booth, J. Bewersdorf, G. Shtengel, H. Hess, P. Tinnefeld, and A. Honigmann, “The 2015 super-resolution microscopy roadmap”, *Journal of Physics D: Applied Physics* 48(44), 443001 (2015).
24. K. Xu, G. Zhong, and X. Zhuang, “Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons”, *Science* 339(6118), 452-456, (2013).
25. R. Jungmann, M. S. Avendaño, J. B. Woehrstein, M. Dai, W. M. Shih, and P. Yin, “Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT”, *Nature Methods* 11(3), 313, (2014).

A tézispontokhoz kapcsolódó tudományos közlemények

- T1.** G. Gajdatsy, and **M. Erdelyi**, “Analysis of focus distortion based on birefringence”, Journal of Optics A-Pure and Applied Optics 9, 982-987 (2007).
- T2.** **M. Erdelyi**, M. Bereznai, G. Gajdatsy, and Z. Bor, “Three-dimensional focus manipulation by means of a birefringent plate”, Optics Communications 281, 4807-4811 (2008).
- T3.** **M. Erdelyi**, and G. Gajdatsy, “Radial and azimuthal polarizer by means of a birefringent plate,” Journal of Optics A-Pure and Applied Optics 10, 055007, (2008).
- T4.** **M. Erdelyi**, and Z. Bor, “Radial and azimuthal polarizers”, Journal of Optics A-Pure and Applied Optics 8, 737-742, (2006).
- T5.** G. Gajdatsy, L. Dudas, **M. Erdelyi**, and G. Szabo, “Line-scanning tomographic optical microscope with isotropic transfer function”, Journal of Optics 12, 115505, (2010).
- T6.** L. Dudás, G. Gajdatsy, J. Sinkó, **M. Erdélyi**, and G. Szabó, “Correction of error motion in a line-scanning tomographic optical microscope”, Appl Opt 51, 6319-6324, (2012).
- T7.** G. Szabó, **M Erdélyi**, G. Gajdatsy, and L. Dudás, “Optical microscope system and method carried out therewith for reconstructing an image of an object”, U.S. Patent 8,693,091, (2014).
- T8.** J. Sinkó, L. Dudás, G. Gajdatsy, **M. Erdélyi**, and G. Szabó, “Map-free line-scanning tomographic optical microscope”, Opt Lett 36, 4011-4013, (2011).
- T9.** J. Sinko, G. Szabo, and **M. Erdelyi**, “Ray tracing analysis of inclined illumination techniques”, Optics Express 22, 18940-18948, (2014).
- T10.** G. S. Kaminski Schierle, S. van de Linde, **M. Erdelyi**, E. K. Esbjörner, T. Klein, E. Rees, C. W. Bertoncini, C. M. Dobson, M. Sauer, and C. F. Kaminski, “In situ measurements of the formation and morphology of intracellular β -amyloid fibrils by super-resolution fluorescence imaging”, J Am Chem Soc 133, 12902-12905, (2011).
- T11.** E. Esbjorner, F. Chan, E. Rees, **M. Erdelyi**, L. Luheshi, C. Bertoncini, C. Kaminski, C. Dobson, and G. Schierle, “Direct Observations of Amyloid beta Self-Assembly in Live Cells Provide Insights into Differences in the Kinetics of A beta(1-40) and A beta(1-42) Aggregation”, Chemistry & Biology 21, 732-742, (2014).
- T12.** M. Ahn, E. De Genst, G. S. Kaminski Schierle, **M. Erdelyi**, C. F. Kaminski, C. M. Dobson, and J. R. Kumita, “Analysis of the native structure, stability and aggregation of biotinylated human lysozyme”, PLoS One 7, e50192, (2012).
- T13.** **M. Erdelyi**, E. Rees, D. Metcalf, G. Schierle, L. Dudas, J. Sinko, A. Knight, and C. Kaminski, “Correcting chromatic offset in multicolor superresolution localization microscopy”, Optics Express 21, 10978-10988, (2013).
- T14.** E. Rees, **M. Erdelyi**, G. S. K. Schierle, A. Knight, and C. F. Kaminski, “Elements of image processing in localization microscopy”, Journal of Optics 15(9), 094012, (2013).
- T15.** D. Metcalf and **M. Erdélyi**, “Single molecule pointillism, Challenges in localization based super-resolution microscopy”, Imaging and Microscopy 14(3), 39-41, (2012).

- T16.** J. Sinko, R. Kakonyi, E. Rees, D. Metcalf, A. Knight, C. Kaminski, G. Szabo, and **M. Erdelyi**, “TestSTORM: Simulator for optimizing sample labeling and image acquisition in localization based super-resolution microscopy”, *Biomedical Optics Express* 5, 778-787, (2014).
- T17.** J. Manetsberger, J. D. Manton, **M. J. Erdelyi**, H. Lin, D. Rees, G. Christie, and E. J. Rees, “Ellipsoid Localization Microscopy Infers the Size and Order of Protein Layers in Bacillus Spore Coats”, *Biophys J* 109, 2058-2066, (2015).
- T18.** **M. Erdelyi**, J. Sinko, R. Kakonyi, A. Kelemen, E. Rees, D. Varga, and G. Szabo, “Origin and compensation of imaging artefacts in localization-based super-resolution microscopy”, *Methods* 88, 122-132, (2015).
- T19.** T. Novak, T. Gajdos, J. Sinko, G. Szabo, and **M. Erdelyi**, “TestSTORM: Versatile simulator software for multimodal super-resolution localization fluorescence microscopy”, *Scientific Reports* 7(1), 1-8, (2017).
- T20.** **M. Erdelyi**, J. Sinko, T. Gajdos, and T. Novak, “Enhanced simulator software for image validation and interpretation for multimodal localization super-resolution fluorescence microscopy”, in *Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging X*, SPIE 10071, 100710X, (2017).
- T21.** J. Sinko, T. Gajdos, E. Czvik, G. Szabo, and **M. Erdelyi**, “Polarization sensitive localization based super-resolution microscopy with a birefringent wedge”, *Methods and Applications in Fluorescence* 5(1), 017001, (2017).
- T22.** T. Gajdos, Z. Cserteg, S. Szikora, T. Novak, B. Kovacs, G. Szabo, J. Mihaly, and **M. Erdelyi**, “mmSTORM: Multimodal localization based super-resolution microscopy”, *Scientific Reports* 9(1), 1-9, (2019).
- T23.** D. Varga, H. Majoros, Z. Ujfaludi, **M. Erdelyi**, and T. Pankotai, “Quantification of DNA damage induced repair focus formation via super-resolution dSTORM localization microscopy”, *Nanoscale* 11, 14226-14236, (2019).
- T24.** D. Varga, H. Majoros, Zs. Ujfaludi, T. Pankotai, and **Miklós Erdélyi** “Quantification of labelled target molecules via super-resolution dSTORM localization microscopy”, *SPIE 11246, Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging XIII*, 1124612, (2020).
- T25.** S. Szikora, T. Gajdos, T. Novák, D. Farkas, I. Földi, P. Lenart, **M. Erdélyi**, and J. Mihály, “Nanoscopy reveals the layered organization of the sarcomeric H-zone and I-band complexes”, *The Journal of cell biology* 219(1), (2020).
- T26.** **M. Erdelyi**, J. Simon, E. Barnard, and C. Kaminski, “Analyzing Receptor Assemblies in the Cell Membrane Using Fluorescence Anisotropy Imaging with TIRF Microscopy”, *Plos One* 9(6), (2014).
- T27.** F. Gielen, M. Butz, E. Rees, **M. Erdelyi**, T. Moschetti, M. Hyvonen, J. Edel, C. Kaminski, and F. Hollfelder, “Quantitative Affinity Determination by Fluorescence Anisotropy Measurements of Individual Nanoliter Droplets”, *Analytical Chemistry* 89, 1092-1101 (2017).
- T28.** T. Davies, N. Kodera, G. Schierle, E. Rees, **M. Erdelyi**, C. Kaminski, T. Ando, and M. Mishima, “CYK4 Promotes Antiparallel Microtubule Bundling by Optimizing MKLP1 Neck Conformation”, *Plos Biology* 13(4), (2015).